

Foto: Odílio B. G. Assis



Metodologia Mínima para a Produção de Filmes Comestíveis de Quitosana e Avaliação Preliminar de seu Uso como Revestimento Protetor em Maças Cortadas

Odílio Benedito Garrido Assis¹
Henrique Cezar Alves²

O revestimento de frutas e legumes com filmes comestíveis tem chamado a atenção do seguimento de embalagens, principalmente como uma oportunidade promissora para a criação de novos mercados no setor. Norteados por um aumento contínuo pela demanda por alimentos minimamente processados associados a uma crescente conscientização ambiental, por parte dos consumidores, que cada vez mais requerem o emprego de materiais renováveis e biologicamente não agressivos, abre-se assim grandes oportunidades para o desenvolvimento de tecnologias específicas que atendam a essas novas exigências.

Em especial os seguimentos de frutas e vegetais conhecidos como "fresh-cut" e "ready-to-eat", requerem uma atenção especial. Para esses a tecnologia de revestimento deve estar focada para manutenção da qualidade e aumento do tempo de prateleira (Wiley, 1997). Não somente as propriedades nutricionais, mas a forma, o aroma e o sabor têm grande apelo nas vendas de produtos minimamente processados. Como destacado pelas análises de Ahvenainen, 1996, e por Nassu et al., 2001, a preocupação dos consumidores ao comprarem produtos processados recai, primeiramente, na aparência fresca e em uma textura relativamente ausente de defeitos. A manutenção dessas características ainda é um desafio. Uma vez colhido, o produto inicia um processo natural e

irreversível de degradação. Além de que, danos físicos provocados por qualquer tipo de processo externo (como por exemplo riscos superfícies involuntários, ferimentos e aberturas na casca, impactos, pressão localizadas, etc.) que venha a ser sofrido pelo fruto após a colheita, estimula significativamente a respiração acelerando as degradações naturais.

Dados recentes demonstram que filmes obtidos a partir de derivados de proteínas e lipídios podem ser aplicados, com relativo sucesso, como coberturas semipermeáveis objetivando a extensão da vida útil de frutas tropicais (Tanada-Palmu et al., 2002). Além das proteínas, os polissacarídeos têm sido avaliados como uma alternativa consideravelmente econômica e eficiente para esse fim, sendo a quitosana o sacarídeo mais estudado (Coma et al., 2002).

A quitosana é um polímero natural derivado do processo de desacetilação da quitina, que é tido como o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza. Sua estrutura é formada pela repetição de unidades beta (1-4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose (ou D-glucosamina) apresentando uma cadeia polimérica similar à da celulose, conforme expressa na Figura 1. Devido a suas características atóxicas e de fácil formação de géis, a quitosana tem sido considerada a décadas como um composto de interesse industrial e

¹ Físico, Dr., Embrapa Instrumentação Agropecuária, Caixa Postal 741, CEP 13560-970, São Carlos-SP, e-mail: odilio@cnpdia.embrapa.br

² Estagiário técnico junto a Embrapa Instrumentação Agropecuária

especialmente de uso farmacêutico (Campana-Filho & Desbrières, 2000). Recentemente contudo, uma série de estudos tem sido publicada caracterizando o uso da quitosana como coberturas de alimentos ou revestimentos protetores em frutas e legumes processados (Shahidi et al, 1999; Coma et al., 2002). Esses trabalhos enfocam, essencialmente, as propriedades antifúngicas e antibacterianas da quitosana, conforme mostrado por No et al, 2002, indicando por conseguinte o seu uso potencial sobre superfícies cortadas ou sobre frutos com alta taxa de maturação pós-colheita.

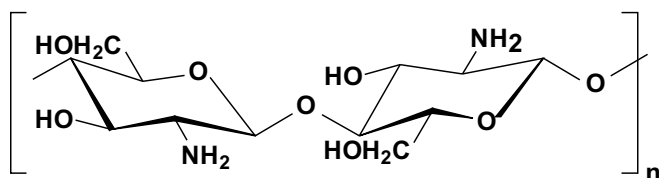


Figura 1. Representação esquemática da estrutura primária da quitosana, sendo n o grau de polimerização.

As diferentes características do produto comercial, contudo, é um dos aspectos que dificulta seu pleno uso na indústria alimentícia. As quitosanas disponíveis, principalmente no Brasil, são de procedências diversas e apresentam diferentes graus de pureza e densidade molar, além de não seguirem industrialmente um procedimento comum de desacetilação, o que torna os materiais comerciais consideravelmente diferentes entre si (Battisti, 2002). Essa característica dificulta a obtenção de filmes e revestimentos reprodutíveis (Assis, et al, 2002(c)). Outro aspecto importante é que as quitosanas comerciais são solúveis somente em pHs ácidos, o que pode gerar reações com a superfície a ser revestida, alterando o aspecto e sabor da polpa, embora o filme final, em princípio, seja transparente. Contudo, a quitosana tem sido internacionalmente aceita como material promissor para de revestimento frutas e neste comunicado será apresentado um procedimento mínimo para a produção de filmes de quitosana e discutido alguns resultados qualitativos preliminares com respeito ao revestimento de fatias maçãs da cv. Gala.

A quitosana empregada neste trabalho foi obtida em farmácias de manipulação, sendo, segundo informação inscrita, procedente da purificação de quitinas extraídas de cascas de camarão. Esse material apresenta aspecto granular, ligeiramente amarelado e pode ser classificado como de média massa molar (Signini & Campana-Filho, 1998).

Os géis foram preparados por dissolução sob agitação moderada em ácido acético 0,5 M até equilíbrio em pH próximo a 3, para soluções com concentrações de quitosana de 3, 10, 15, 20 e 50 g/L. Este pH foi adotado por ser teoricamente o de máxima solubilidade da quitosana. Períodos de até 24 horas de agitação foram necessários para obter uma total homogeneização da solução. Para simplificar o processo todo o procedimento foi realizado sob temperatura ambiente.

Frutos comerciais de maçãs da cv. Gala foram seccionadas em fatias e as amostras mergulhadas, separadamente, com a ajuda de um suporte metálico, nas diversas concentrações filmogênicas. Após o escoamento do excesso, foram deixadas secar em condições ambientes.

A cura (polimerização) do filme se deu espontaneamente como consequência da evaporação do solvente. A Figura 2 esquematiza a sequência empregada.

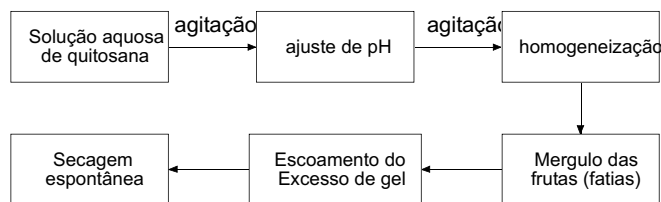


Figura 2. Sequência empregada para processamento de gel e depósito.

Os géis resultantes das várias concentrações foram bastante similares na aparência e com alterações evidentes nas viscosidades em função do montante de quitosana adicionada. Ligeira mudança na coloração é igualmente observada para concentrações superiores a 15 g/L, com tendência a um tom amarelado suave. Contudo, os filmes resultantes, independentes da concentração, foram todos transparentes.

Análises microscópicas detalhadas dos filmes resultantes nas diversas concentrações foram realizadas anteriormente (Assis, et al., 1999; Vieira et al., 1999; Assis, et al, 2002(e)) e indicaram estruturas descontínuas, caracterizando certa porosidade residual no filme depositado, conforme imagem típica apresentada na Figura 3. Filmes totalmente densos e impermeáveis são indesejáveis para coberturas de frutos, pois é necessário que haja nos revestimentos a manutenção da respiração, principalmente permitindo trocas gasosas e a permeação de oxigênio de dióxido de carbono (Caner et al, 1998).

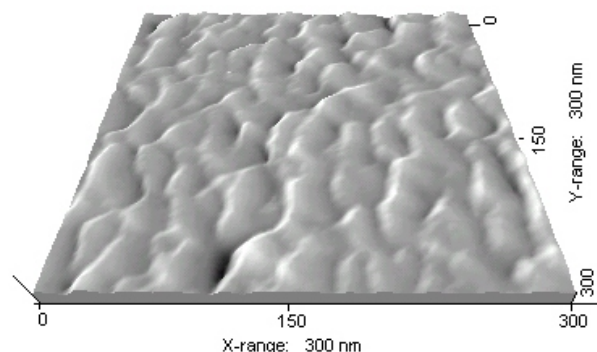


Figura 3 Imagem típica de um filme de quitosana, obtido por microscopia de força atômica, onde é possível observar a estrutura descontínua e a porosidade residual do filme curado.

A literatura tem mostrado que polímeros hidrofílicos, especialmente os altamente polares como a quitosana, podem, em função da umidade relativa do ar, mudar significativamente a permeabilidade a gases. Resultados apresentados por McHugh & Krochta em 1994, mostraram que para uma porosidade específica, a permeação é sensivelmente reduzida com o abaixamento da concentração de água adsorvida. Na realidade, a permeabilidade do filme pode ser alterada devida não somente a umidade ambiental mas principalmente pela incorporação de elementos aquosos celulares oriundos da polpa da fruta (Baldwin et al, 1996).

A concentração de quitosana no gel e por conseguinte no filme, reflete diretamente sobre a afinidade pela água e

demais soluções aquosas. Conforme dados apresentados na Figura 4, obtidos da avaliação do ganho de água nos filmes processados, segundo medida normalizada (ASTM Standard Method C97-96), indica um crescimento do tipo exponencial com o aumento da concentração de quitosana no filme. Este resultado é similar ao observado por Lieberman em 1972 para filmes comestíveis baseados em colágeno. Os dados da Figura 4 confirmam a natureza hidrofílica da quitosana e sua pobre eficiência como barreira de proteção à umidade, sendo que resultados mais detalhados podem ser encontrados em Assis et al, 2002(a). Contudo, é de importância notar que certa hidratação assegura uma aparência fresca à superfície cortada.

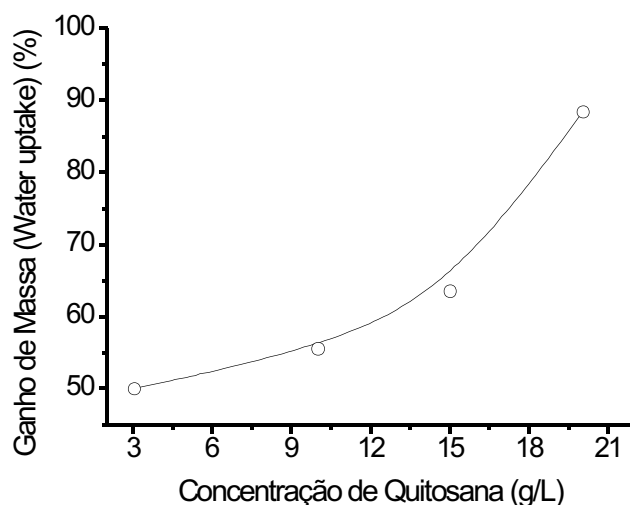


Figura 4. Porcentagem de massa adquirida por absorção de água (water uptake) em função da concentração de quitosana no revestimento. Medidas realizadas segundo normalização ASTM Standard Method C97-96.

O alto grau de hidrofiliabilidade da quitosana tem sido atribuído aos grupos desacetilados presentes na cadeia polimérica, ao redor dos quais é favorecida uma grande migração de moléculas de água. Adicionalmente a estrutura porosa característica desses filmes contribui para uma fácil retenção de água na matriz. O principal aspecto negativo da presença de água nesses filmes é que esta acelera os processos degradativos. A água provoca intumescimento e dilatação da estrutura polissacarídica, o que reduz a aderência e pode gerar rupturas e escamações das camadas subjacentes, expondo a superfícies a uma rápida ação bacteriana e ao crescimento de fungos.

A acidez do filme exerce também certo efeito sobre os processos degenerativos da cobertura. Os resultados têm indicado que maiores concentrações de quitosana alteram o pH inicial da diluição, com estabilização em valores mais alcalinos. Esta tendência é mostrada na Figura 5, que atinge valores próximos a 3.6 para concentrações superiores a 20g/L. Na prática esta pequena alteração de pH mostra-se importante na aparência final das superfícies revestidas. Para as maiores concentrações, i.e., maiores pHs, o escurecimento devido às reações é consideravelmente reduzido, o que mostra a forte influência da acidez na preservação da polpa (Assis et al., 2002(b)).

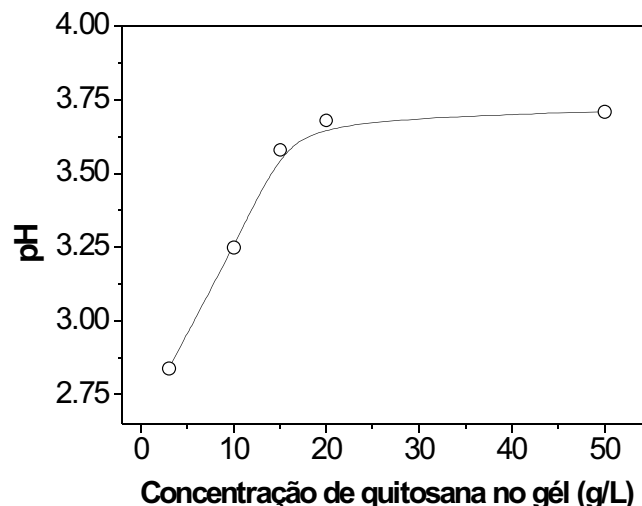


Figura 5. Variação do pH na solução filmogênica em função da concentração de quitosana

O escurecimento da face cortada é atribuído a dois mecanismos que ocorrem simultaneamente: i) a rápida oxidação devida ação ácida do gel de quitosana sobre a face cortada e ii) ao escurecimento natural em função de ações enzimáticas da polifenoloxidase (PPO), que ocorre em superfícies injuriadas e se dá em diferentes intensidades conforme medidas realizadas por Sapers e Douglas em 1987.

Embora a solução ácida gere oxidações na superfície a ser revestida, observamos que o tempo em que as fatias são imersas no gel, que pela metodologia adotada (Figura 2), que não é superior a 6-8 segundos, aparentemente não interfere na coloração final da superfície revestida.

As extensões dos danos provocadas pela ação ácida podem ser, em princípio, atenuadas pelo uso de agentes alcalinos que misturados ao gel ajustam o pH em níveis menos agressivos. Contudo, tentativas preliminares em reduzir o pH da solução de quitosana resultaram na formação de géis não satisfatórios para revestimentos (Assis et al., 2002(e)). Um revestimento polimérico ideal para uso em alimentos, evidentemente, deve ser completamente inerte, com ausência de impacto sobre a polpa ou introdução e alteração de cores na casca ou demais partes do fruto.

O teor de quitosana igualmente apresenta relação com a aderência do filme sobre a superfície depositada. Análises qualitativas, conduzidas após 24 horas de secagem, por tentativa de remoção e raspagem do filme, indicaram essa correspondência. Na Tabela 1 estão apresentados os dados onde para maiores concentrações de quitosana, a aderência estabelecida é avaliada como fraca, ou seja., facilmente removível por destacamento. Uma possível razão para este comportamento pode estar relacionado a espessura e às características dos aglomerados de quitosana nos filmes formados. Quanto maior a concentração, maior a formação de agregados ou material não totalmente dissolvido no gel. A formação do filme se dará como resultado de uma deposição conjunta desses agregados (Assis & Campana-Filho, 2002), que ocorre de forma irregular, diminuindo a área efetiva de contato, reduzindo por conseguinte, a aderência do filme.

Tabela 1. Características de aderência

Concentração de quitosana (g/L)	Aderência sobre a superfície cortada
3,0	Boa
10,0	Boa
15,0	Boa
20,0	Fraca
50,0	Fraca

Um aspecto importante, como já citado, é a manutenção da respiração do fruto através do filme depositado. Esta característica pode ser indiretamente avaliada pela perda de massa em função do tempo, tendo por referências amostras seccionadas sem filmes. Nas medidas realizadas vimos que nas concentrações de quitosana empregadas, pouca influência ocorre com respeito a perda de massa. Os melhores resultados foram para a concentração de 20 g/L, que assegurou uma redução mais expressiva da perda de massa, principalmente nos primeiros 5 dias de estocagem, conforme curvas apresentadas na Figura 6. Esses resultados são relevantes uma vez que as frutas fatiadas ou sujeitas a qualquer processo de corte, naturalmente não deverão ser armazenadas e/ou expostas ao consumidor por períodos superiores a 5 dias, em condições não controladas. De qualquer forma fica comprovada a redução da respiração pelo revestimento com quitosana, estabelecendo assim uma menor taxa de maturação do fruto revestido.

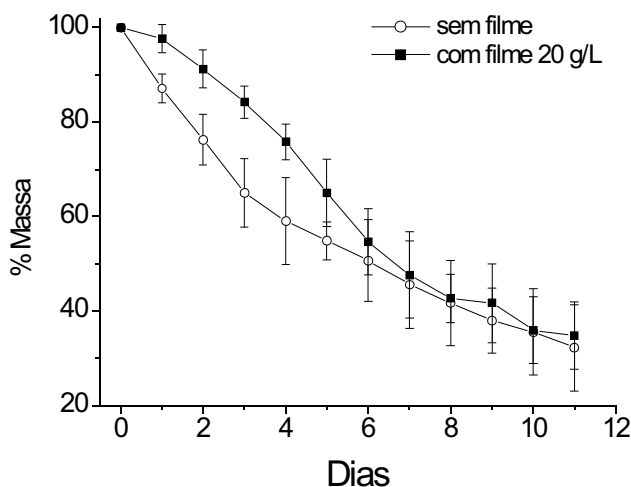


Figura 6. Evolução da perda de massa para amostras fatiadas em condições não controladas de armazenamento, ao longo do tempo. Os melhores resultados são para os primeiros dias e para amostras revestidas com filmes na concentração de 20 g/L.

O caráter antifungal da quitosana foi avaliado qualitativamente através do acompanhamento fotográfico das faces cortadas nas diversas concentrações em condições ambientais naturais. Embora não tenha sido realizado um acompanhamento rigoroso das culturas e espécies de fungos, de um modo geral, todos os filmes apresentaram boa ação antifúngica. Fica visualmente claro essa ação ao comparar-se as maçãs revestidas com filmes e as não revestidas. Na Figura 7 temos, com caráter ilustrativo, a aparência das faces cortadas de uma mesma maçã, após 3 dias, onde em (A) temos a superfície recoberta (15 g/L) e em (B) a superfície sem revestimento. Em ambas vê-se claramente o início do processo de desidratação e degradação natural, este é mais significativo na amostra não revestida.

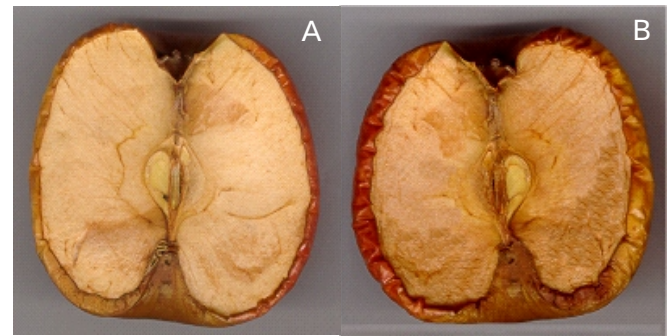


Figura 7. Aparência após 3 dias do corte. (A) superfície revestida e (B) face sem cobertura.

Nos testes preliminares apresentados neste trabalho confirma-se a habilidade da quitosana comercial na formação de soluções em concentrações variadas, apropriadas ao revestimento de frutas. O processo de formação dos géis mostrou-se consideravelmente simples, não necessitando de procedimentos ou recursos sofisticados. Com o avançar das pesquisas, melhoras certamente deverão ser conseguidas com respeito a acidez e aderência dos filmes sobre as superfícies processadas.

Referências Bibliográficas

- AHVENAINEN, R. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruits and vegetables. *Trends in Food Science and Technology*, Cambridge, v. 7, n. 6, p. 179-187, 1996.
- ASSIS, O. B. G., ALBERTINI, L. L., FLORES, A. M. Water sorption of chitosan films: preliminary study for protective edible coatings on sliced fruits In: *INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NATURAL POLYMERS AND COMPOSITES-ISNAPOL*, 4., São Pedro, 2002. ISNAPOL 2002: proceedings. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2002(a). 4 f. 1 CD Rom.
- ASSIS, O. B. G.; ALVES, H. C.; PESSOA, J. D. C. Avaliação preliminar do uso de quitosana como revestimento protetor em maçãs cortadas. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA*, 17., 2002, Belém. Os novos desafios da fruticultura brasileira. [Belém: SBF: EMBRAPA: Governo do Pará], 2002(b). 5 f. 1 CD-ROM.
- ASSIS O. B. G., ALVES, H.C, PESSOA J. D. C. Chitosan thin-film preparation for uses as edible and fungi growth inhibitor coating on sliced fruits. *Submetido ao Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2002(c).
- ASSIS. O. B. G., CAMPANA-FILHO, S. P. Chitosan self-assembled thin-film: influence of solution concentration on film roughness and thickness. In: *SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE POLÍMEROS*, 8.; *CONGRESO IBEROAMERICANO DE POLÍMEROS*, 6.; *SIMPOSIO IBEROAMERICANO DE QUITINA*, 2.; *CONGRESO NACIONAL DE POLÍMEROS*, 15., 2002, Acapulco. SLAP' 2002: SIAQ 2002: libro de resúmenes. Acapulco: Sociedad Polimerica de Mexico, 2002(d). AS 1997. p.65-129.

ASSIS, O. B. G.; VIEIRA, D.C.; BERNARDES-FILHO, R. Surface Evaluation of Self-Assembled Multilayered Organic Films by AFM. Scanning: the journal of scanning microscopy, Mahwah, v. 21, n. 2, 71-72, 1999.

ASSIS O. B. G.; VIEIRA, D. C.; BERNARDES-FILHO R.; CAMPANA-FILHO, S. P. AFM characterization of chitosan self-assembled films. International Journal of Polymeric Materials, London, v. 51, n. 7, p. 633-638, 2002(e).

BALDWIN, E. A.; NISPEROS, M. O.; CHEN, X.; HAGENMAIER, R. D. Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. Postharvest Biology and Technology, Amsterdam, v. 9, p. 151-163, 1996.

BATTISTI, M. V. Obtenção e caracterização de quitina e quitosana de Macrobrachium rosenbergii. 2002. 89 f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

CAMPANA-FILHO, S. P.; DESBRIÈRES, J. Chitin, chitosan and derivatives. In: FROLLINI, E.; LEÃO, A. L.; MATTOSO, L. H. C. (Ed.). Natural polymers and agrofibras composites. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária: USP-Instituto de Química de São Carlos: UNESP-Faculdade de Ciências Agrônomicas, 2000. p. 41-71.

CANER, C.; VERGANO, P. J.; WILES, J. L. Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and storage. Journal of Food Science, Chicago, v. 63, n. 6, p. 1049-1053, 1998.

COMA, V.; MARTIAL-GROS, A.; GARREAU, S.; COPINET, A.; SALIN, F.; DESCHAMPS, A. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. Journal of Food Science, Chicago, v. 67, n. 3, p. 1162-1169, 2002.

LIEBERMAN, E. R.; GILBERT, S. G.; SRINIVASA, V. The use of gas permeability as a molecular probe for the study of crosslinked collagen structure. Transactions of the New York Academy of Sciences, New York, v. 34, p. 694-708, 1972.

MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Permeability properties of edible films. In: KOCHTA, J. M. et al. (Ed.). Edible coatings and films to improve food quality. Lancaster: Technomic Publishing, 1994. p. 139-187.

NASSU, R. T.; LIMA, J. R.; SOUZA FILHO, M. S. M. Consumer's acceptance of fresh and combined methods processed melon, mango and cashew apples. Revista Brasileira de Fruticultura, Cruz das Almas, v. 23, n. 3, p. 551-554, 2001.

NO, H. K.; PARJ, N. Y.; LEE, S. H.; MEYERS, S. P. Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 74, p. 65-72, 2002.

SAPERS, G. M.; DOUGLAS, F. W. Measurement of enzymatic browning at cut surfaces and in juice of raw apple and pear fruits. Journal of Food Science, Chicago, v. 52, p. 1258-1262, 1987.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. J. Food applications of chitin and chitosans. Trends in Food Science & Technology, Cambridge, v. 10, p. 37-51, 1999.

SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S.P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. Polímeros: Ciência e Tecnologia, São Carlos, v. 8, n. 4, p. 63-68, 1998.

TANADA-PALMU, P.; FAKHOURI, F. M.; GROSSO, C. R. F. Filmes biodegradáveis: Extensão da vida útil de frutas tropicais. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, n. 26, p. 12-17, maio/junho 2002.

VIEIRA, D. C.; ASSIS, O. B. G.; BERNARDES-FILHO, R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Pore-size estimation of chitosan thin-film by atomic force microscopy. Acta Microscopica, Maracariço, v. 8 (Supp. A), p. 317-318, 1999.

WILEY, R. C. Métodos de conservación de las frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas. In: WILEY, R. C. (Ed.). Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas. Zaragoza: Editorial Acirbia,

Comunicado Técnico, 49

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Rua XV de Novembro, 1542 - Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: 16 274 2477
Fax: 16 272 5958
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br
www.cnpdia.embrapa.br

1a. edição
1a. impressão 2002: tiragem 300

Comitê de Publicações

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Secretária Executiva: Janis Aparecida Baldoviniotti
Membros: Dr. Odílio Benedito Garrido de Assis,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Rubens Bernardes Filho,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Membro Suplente: Débora Marcondes B. P. Milori

Expediente

Supervisor editorial: Dr. Odílio B. Garrido de Assis
Revisão de texto: Janis Aparecida Baldoviniotti
Tratamento das ilustrações: Valentim Monzane
Editoração eletrônica: Valentim Monzane